

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Pelaksanaan

Pelaksanaan penelitian terbagi dalam dua lokasi. Kultur dan pengembangbiakan jamur *Aspergillus niger* dilaksanakan di Laboratorium Bioindustri, Jurusan Teknologi Industri Pertanian, Fakultas Teknologi Industri Pertanian, Universitas Brawijaya, Malang. Proses ekstraksi pigmen dan pengujian stabilitas pigmen dilakukan di Laboratorium Teknologi Agrokimia, Jurusan Teknologi Industri Pertanian, Universitas Brawijaya, Malang. Penelitian dilaksanakan mulai 22 September 2017 sampai 9 Oktober 2017.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi botol kaca gelap ukuran 250 mL, tabung *erlenmeyer* (Schott Duran), gelas ukur (Herma), spatula (Herma), cawan (Herma), cawan petri (Schott Duran), tabung reaksi, bunsen, jarum ose, timbangan analitik (AND), autoklaf (Hirayama HVE-50), sentrifugasi (Thermo Scientetific/SL 40), termometer, pH-meter (Trans Instrument), spektrofometri UV-vis (Thermo Scientetific), vortex (Dathan Scientetific VM-10), mikro pipet (One-Medical), dan *color reader*.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah beras IR-36, kultur *Aspergillus niger*, Akuades (Hydrobatt), Alkohol 70%, HCL, NaOH, KOH, Metanol, Etanol, Etil Asetat, Benzena, Heksana, Klorofoam, Aseton, H₂O₂, Tween 80%, Spiritus, kapas, kasa, alumunium *foil* (Total Warp), kertas coklat, kertas saring WhatMan, karet gelang, dan *plastic warp* (Klin Pak).

3.3 Batasan Masalah

Permasalahan yang dibatasi dalam penelitian ini adalah:

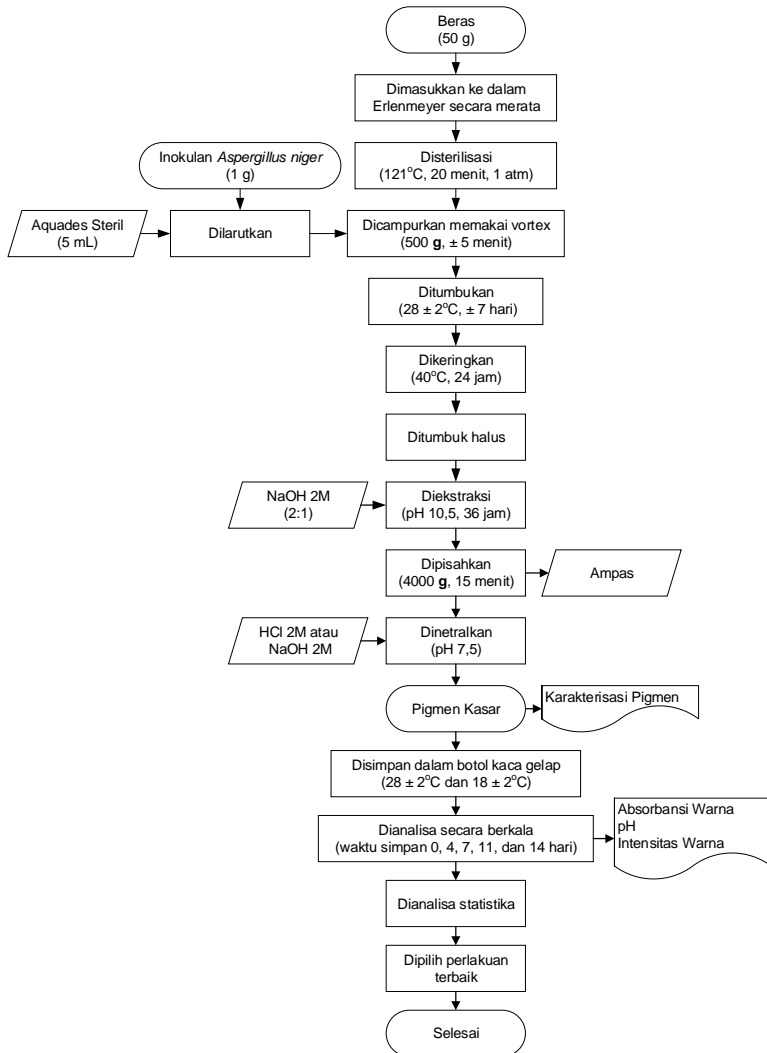
1. Proses ekstraksi dilakukan sampai mendapat pigmen kasar
2. Proses ekstraksi dan netralisasi dilakukan pada suhu ruang Kota Malang ($28 \pm 2^{\circ}\text{C}$).
3. Karakterisasi pigmen dilakukan sebatas karakterisasi fisik.
4. Penyimpanan pigmen dilakukan pada botol kaca gelap ukuran 250 mL.
5. Penelitian dilakukan dalam skala laboratorium.

3.4 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian merupakan tahapan penelitian yang saling terkait. Penelitian dilakukan dari menumbuhkan jamur, ekstraksi pigmen, sampai proses pengujian stabilitas pigmen. Metode penelitian dapat dilihat pada **Gambar 3.1**.

3.4.1 Penelitian Pendahuluan

Pada penelitian pendahuluan dilakukan proses menumbuhkan jamur, ekstraksi pigmen, karakterisasi pigmen, pengukuran absorbansi, dan penentuan perlakuan. Proses pertumbuhan jamur dilakukan pada dua media yang berbeda, media agar dan beras. Media yang dipilih untuk pertumbuhan jamur adalah beras. Proses ekstraksi menggunakan metode *alkali-acid*y. Karakterisasi pigmen menggunakan larutan asam, basa, pelarut organik, dan zat oksidatif. Pengukuran absorbansi dilakukan untuk menentukan nilai absorbansi tertinggi sebagai nilai *optical density* (OD). Perlakuan yang dipilih adalah stabilitas pigmen berdasarkan faktor suhu dan lama penyimpanan.



Gambar 3.1 Diagram Alir Penelitian

3.4.2 Rancangan Penelitian

Penelitian dilakukan untuk stabilitas pigmen kasar *Aspergillus niger* berdasarkan parameter penyimpanan. Rancangan yang digunakan adalah rancangan tersarang (*nested design*) dengan faktor utama suhu penyimpanan dan faktor tersarang waktu penyimpanan. Pigmen kasar disimpan dalam botol kaca gelap berdasarkan suhu perlakuan. Suhu yang digunakan adalah suhu ruang Kota Malang ($28 \pm 2^{\circ}\text{C}$), mendekati suhu penyimpanan kawasan tropis, dan suhu iklim sedang ($18 \pm 2^{\circ}\text{C}$) (Zozio *et al*, 2011). Proses penyimpanan yang dilakukan melebihi jangka pendek, 10 hari. Waktu penyimpanan dilakukan selama 14 hari dengan periode pengujian stabilitas pada penyimpanan 0, 4, 7, 11 dan 14 hari. Rancangan percobaan dilakukan sebanyak 3 kali perulangan.

Faktor utama suhu penyimpanan (T) terdiri dari 2 level, yaitu:

T1 = suhu $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$

T2 = suhu $18 \pm 2^{\circ}\text{C}$

Faktor tersarang lama waktu simpan (D) terdiri dari 4 level, yaitu:

D1 = 4 hari

D2 = 7 hari

D3 = 11 hari

D4 = 14 hari

Tabel 3.1 Kombinasi Perlakuan

Faktor Utama	T1				T2			
	D1	D2	D3	D4	D1	D2	D3	D4
Faktor Tersarang								
Perlakuan	T1D1	T1D2	T1D3	T1D4	T2D1	T2D2	T2D3	T2D4

Keterangan kombinasi perlakuan adalah sebagai berikut :

T1D1: Suhu $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ dikombinasikan dengan waktu simpan 4 hari.

T1D2: Suhu $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ dikombinasikan dengan waktu simpan 7 hari.

T1D3: Suhu $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ dikombinasikan dengan waktu simpan 11 hari.

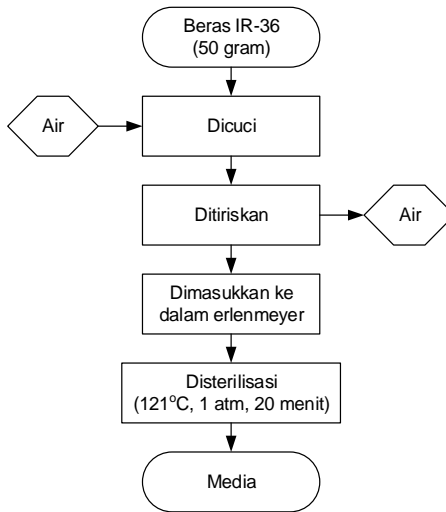
- T1D4: Suhu $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ dikombinasikan dengan waktu simpan 14 hari.
- T2D1: Suhu $18 \pm 2^{\circ}\text{C}$ dikombinasikan dengan waktu simpan 4 hari.
- T2D2: Suhu $18 \pm 2^{\circ}\text{C}$ dikombinasikan dengan waktu simpan 7 hari.
- T2D3: Suhu $18 \pm 2^{\circ}\text{C}$ dikombinasikan dengan waktu simpan 11 hari.
- T2D4: Suhu $18 \pm 2^{\circ}\text{C}$ dikombinasikan dengan waktu simpan 14 hari.

3.5 Pelaksanaan Penelitian

3.5.1 Pembuatan Media Tanam

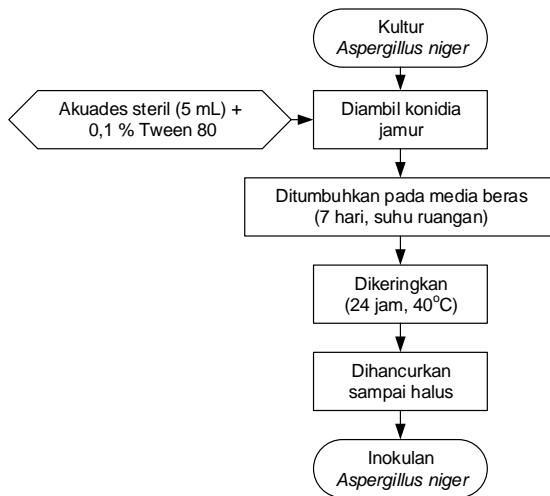
Pembuatan media dilakukan dengan menggunakan beras. Beras yang digunakan merupakan Beras IR-36. Skema pembuatan media beras dapat dilihat pada **Gambar 3.2**. Proses pembuatan media tanam beras adalah sebagai berikut:

1. Beras ditimbang seberat 50 gram.
2. Beras dicuci bersih menggunakan air keran dan ditiriskan sampai air bekas cuci beras tidak ada.
3. Beras dituang pada Erlenmeyer secara merata.
4. Erlenmeyer beserta beras disterilisasi menggunakan suhu 121°C , 1 atm, 20 menit.
5. Erlenmeyer dan beras didiamkan sampai suhu ruang.
6. Media beras siap digunakan.



Gambar 3.2 Diagram Alir Pembuatan Media Beras

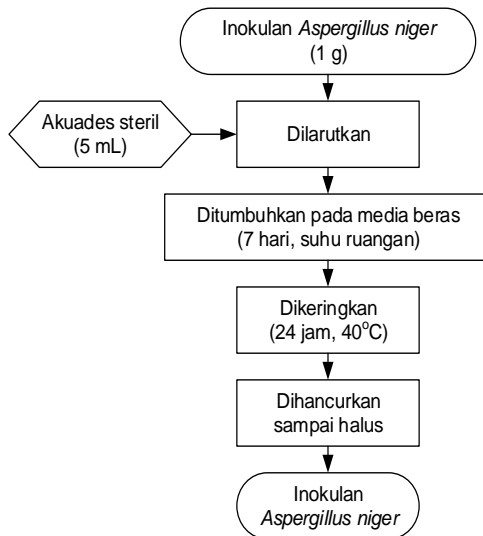
3.5.2 Inokulan *Aspergillus niger*



Gambar 3.3 Diagram Alir Pembuatan Inokulan

Proses pembuatan inokulan *Aspergillus niger* tertera pada **Gambar 3.3**. Secara rinci, proses pembuatan kultur meliputi :

1. Kultur *Aspergillus niger* disiapkan. Kultur jamur didapat dari Laboratorium Mikrobiologi, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya.
2. Diambil 50 mL Akuades steril dan dicampurkan dengan 0,1% Tween 80.
3. Larutan 50 ml Akuades steril + 0,1% Tween 80 dituangkan ke dalam wadah jamur.
4. Konidia jamur diambil dengan menggerus permukaan agar menggunakan jarum ose secara perlahan. Usahakan semua konidia terangkat.
5. Konidia jamur dituangkan pada media beras.
6. Hasil campuran konidia jamur dengan beras diratakan menggunakan vortex, selama 5 menit, dengan 500 g.
7. Jamur ditumbuhkan selama kurang lebih 7 hari pada suhu ruang.
8. Media dan jamur yang telah berumur 7 hari dikeringkan menggunakan oven selama 24 jam dengan suhu 40°C.
9. Media dan jamur dihancurkan dengan ditumbuk menggunakan mortar sampai halus.
10. Inokulan *Aspergillus niger* dapat disimpan dalam lingkungan kering dan tertutup.

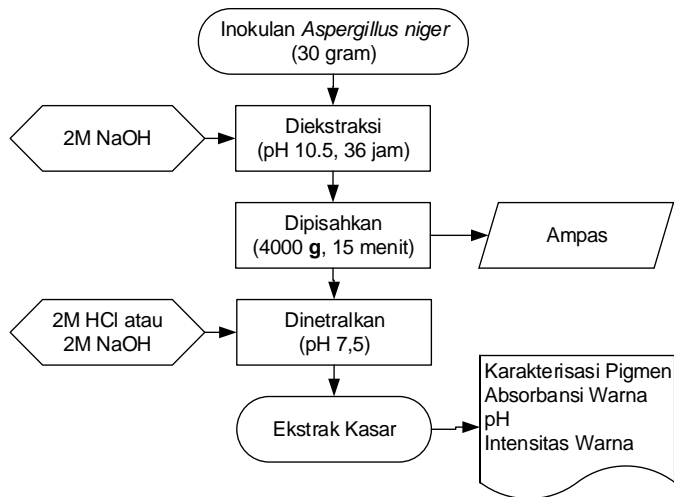


Gambar 3.4 Diagram Alir Perkembangbiakan Kultur

Proses memperbanyak inokulan dilihat pada **Gambar 3.4**. Proses tersebut menggunakan inokulan yang telah ada, sebagai umpan. Secara lebih rinci, proses tersebut meliputi :

1. Inokulan *Aspergillus niger* ditimbang sebanyak satu gram.
2. Disiapkan media beras 50 gram.
3. Inokulan *Aspergillus niger* dilarutkan dengan 5 mL akuades steril.
4. Inokulan *Aspergillus niger* yang telah larut dituangkan ke dalam media beras. Campuran kedua bahan diratakan menggunakan vortex.
5. *Aspergillus niger* ditumbuhkan selama kurang lebih 7 hari pada suhu ruangan.
6. Media dan jamur yang telah berumur tujuh hari dikeringkan menggunakan oven selama 24 jam dengan suhu 40°C.
7. Media dan jamur dihancurkan dengan menumbuk menggunakan mortar sampai halus.
8. Inokulan *Aspergillus niger* dapat disimpan dalam lingkungan kering dan tertutup.

3.5.3 Ekstraksi Pigmen



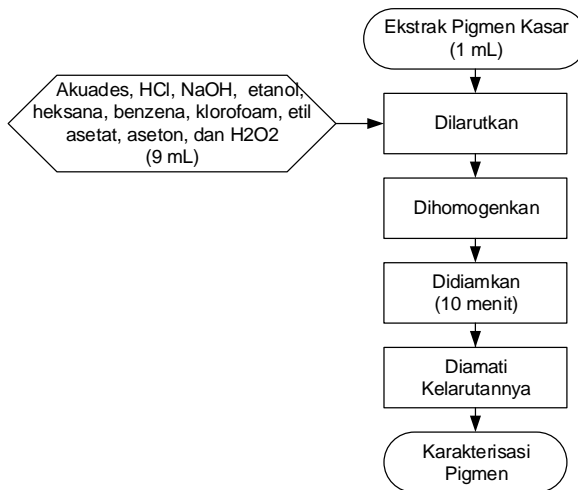
Gambar 3.5 Diagram Alir Ekstraksi Pigmen
(Cassia *et al*, 2005; Goncalves *et al*, 2012)

Ekstraksi pigmen dilakukan berdasarkan penelitian Cassia *et al* (2005) dan Goncalves *et al* (2012). Ekstraksi pigmen dilakukan sampai mendapat ekstrak kasar pigmen coklat kehitaman *Aspergillus niger* tanpa melakukan proses permurnian. Tahapan ekstraksi dapat dilihat pada **Gambar 3.5**. Tahapan tersebut berupa :

1. Inokulan *Aspergillus niger* ditimbang 30 gram dan diletakkan dalam gelas beaker.
2. Ekstraksi dilakukan dalam keadaan alkali. Larutan NaOH 2M (1:10) ditambahkan sampai pH menjadi 10,5.
3. Larutan campuran diratakan menggunakan vortex selama ± 5 menit.
4. Larutan campuran dibiarkan selama 36 jam dalam keadaan tertutup.
5. Hasil ekstraksi dipisahkan menggunakan setrifugasi 4000 **g** selama 15 menit. *Supernatant* hasil ekstraksi diambil untuk proses selanjutnya.

6. Larutan HCl 2M atau NaOH 2M ditambahkan sampai pH menjadi 7,5.
7. Ekstrak kasar pigmen disimpan dalam botol kaca gelap. Ekstrak kasar dikarakterisasi terlebih dahulu sebelum diuji stabilitasnya. Proses pengujian stabilitas ekstrak meliputi absorbansi warna, pH, dan intensitas warna.

3.5.4 Karakterisasi Pigmen



Gambar 3.6 Diagram Alir Karakterisasi Kelarutan Pigmen (Sibero *et al*, 2016)

Proses karakterisasi pigmen dilakukan untuk mengetahui pigmen kasar *Aspergillus niger* mengandung melanin atau tidak dengan menggunakan beberapa bahan kimia (Goncalves *et al*, 2012). Karakterisasi dilakukan pada sifat kelarutan melanin. Uji kelarutan mengacu pada penelitian Sibero *et al* (2016). Urutan proses dapat dilihat pada **Gambar 3.6**. Proses uji kelarutan pigmen adalah sebagai berikut :

1. Ekstrak kasar diambil sebanyak 1 mL.
2. Ekstrak kasar dicampurkan ke dalam beberapa larutan yang masing-masing 9 mL. Penilaian kelarutan pada pelarut akuades, HCl, NaOH, pelarut organik (etanol,

heksana, benzena, klorofoam, etil asetat, aseton), dan *oxidative bleaching agents* (H_2O_2) (Dong and Yao, 2012).

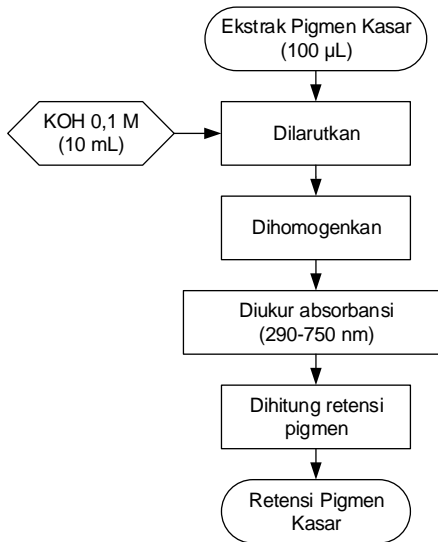
3. Setiap larutan dihomogenasikan menggunakan vortex.
4. Larutan didamkan selama 10 menit.
5. Setiap larutan diamati kelarutannya, larut atau tidak dan berubah warna atau tidak.

3.6 Pengamatan Stabilitas Pigmen

3.6.1 Absorbansi UV-VIS

Proses pengukuran absorbansi dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-VIS (Thermo Scientefic). Penggunaan UV-VIS Spektrofotometer juga dilakukan untuk mengetahui keberadaan melanin pada suatu ekstrak tanpa mengetahui jenis dan struktur melanin yang ada (Butler *et al*, 2005). Proses pengukuran nilai absorbansi mengacu pada metode Sibero *et al* (2016). Urutan proses yang dilakukan seperti pada **Gambar 3.7**. Proses meliputi :

1. Dibuat larutan alkali KOH 0,1 M panas dengan pH 8,0.
2. Ekstrak kasar diambil 1 mL untuk dilarutkan dalam 10 mL KOH 0,1 M.
3. Ekstrak kasar yang telah bercampur dihomogenkan menggunakan vortex.
4. Spektrofotometer dikalibrasi menggunakan 5 mL KOH 0.1 M.
5. Pengukuran nilai absorbansi dilakukan pada rentang gelombang 200-800 nm, di mana 200-400 nm merupakan gelombang UV dan 400-700 nm gelombang cahaya tampak. Pengukuran absorbansi sebagai dasar untuk mendapatkan nilai *optical density* (OD) pigmen. Nilai OD diambil berdasarkan nilai terbesar dalam absorbansi pada gelombang 400-600 nm (Butler *et al*, 2005). Nilai OD periode 0 hari penyimpanan diekspresikan sebagai nilai absorbansi maksimal. Kemampuan pigmen kehilangan absorbansinya selama masa penyimpanan dilambangkan dengan retensi pigmen (Insfran *et al*, 2004). Perhitungan retensi pigmen, mengacu pada penelitian Sanchez *et al* (2006) pada **Lampiran 1**.



Gambar 3.7 Diagram Alir Pengukuran Absorbansi Pigmen
(Sibero *et al*, 2016)

3.6.2 pH

Pengukuran pH dilakukan dengan menggunakan pH meter (Trans Instrument). Pigmen yang dianalisa diambil 10 mL untuk diukur pH. pH meter dicelupkan ke dalam sampel. Nilai pH akan muncul setelah menunggu beberapa saat.

3.6.3 Intensitas Warna

Intensitas warna atau kedalaman warna dilakukan untuk menentukan pigmen. Intensitas warna berkaitan dengan peredaman atau penyerapan warna. Skala intensitas warna terdiri dari warna kuat dan lemah, warna cerah dan redup, warna murni dan kotor. Intensitas warna yang rendah menunjukkan warna yang lemah, warna yang tidak murni, dan warna yang tercampur dengan warna lain (Nugroho, 2015).

Pengukuran intensitas warna menggunakan *color reader*. Notasi warna yang dihasilkan berupa L^* , a^* dan b^* . Nilai L^* melambangkan tingkat gelap-terang. Skala 0

menunjukkan nilai hitam atau gelap dan skala 100 menunjukkan putih atau cerah. a^* merepresentasikan warna hijau (-ve) atau merah (+ve). b^* merepresentasikan warna biru (-ve) atau kuning (+ve) (Prusty *et al*, 2010). Warna gelap memiliki nilai skala yang kecil pada derajat L^* . Melalui notasi L^* , a^* , dan b^* , dapat dilakukan perhitungan total perubahan warna. Perhitungan total perubahan warna dapat dilihat pada **Lampiran 2**.

3.7 Analisa Data

Hasil pengukuran stabilitas pigmen dianalisa dengan *Analysis of Variant* (ANOVA). Parameter yang dianalisa adalah nilai absorbansi, pH, dan intensitas warna pada penyimpanan 0, 4, 7, 11, dan 14 hari. Jika terdapat beda nyata, pengolahan data dilanjutkan menggunakan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) dengan taraf nyata $\alpha = 0,05$ untuk membandingkan nilai antar faktor utama dan faktor tersarang.

3.8 Penentuan Perlakuan Terbaik

Perlakuan terbaik dilakukan untuk menentukan pilihan terbaik berdasarkan nilai absorbansi meliputi sebaran dan puncak, pH, serta intensitas warna. Pemilihan alternatif terbaik dilakukan dengan *Analysis of Variant* (ANOVA). Apa bila ANOVA tidak dapat menentukan perlakuan terbaik, pemilihan dilanjutkan menggunakan metode *Multiple Attribute* (Zelleny, 1982). Prosedur penilaian *Multiple Attribute* dapat dilihat pada **Lampiran 3**.

